

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16133

研究課題名(和文) RNAヘリカーゼによる核小体とストレス顆粒の機能関連制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism by which RNA helicases regulate the functional relationship between nucleoli and stress granules.

研究代表者

平井 悠哉 (Hirai, Yuya)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90710369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：核小体とストレス顆粒の機能関連制御機構を明らかにするため、RNAヘリカーゼであるDDX17に着目し、その細胞内局在や動態を調べた。

DDX17にはp72とp82の2つのアイソフォームが存在し、天然変性領域を余分に持つp82は核小体に局在すること、p82の動態はp72よりも遅いこと、両者共にストレス時にはストレス顆粒に局在するがp72の方が局在する割合が高いこと、酵素活性の欠損変異体では両者共にストレス顆粒に局在し、p82の核小体局在は見られなくなること、が明らかになった。以上より、DDX17は天然変性領域と酵素活性の両方依存的に核小体とストレス顆粒を関連付けるタンパク質であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

液-液相分離による膜を持たないオルガネラの構造制御機構の詳細が次々と明らかになっている。核小体とストレス顆粒は共に膜を持たないオルガネラであり、それらの機能的関連が示唆されるが、その詳細は明らかではない。本研究により、RNAヘリカーゼであるDDX17が、天然変性領域や酵素活性によってその核小体とストレス顆粒への局在を制御していることが明らかになった。本研究成果は、核小体とストレス顆粒の機能的関連のさらなる解明につながるため大きな学術的意義を持つ。また核小体とストレス顆粒は様々な疾患とも関連しており、これら疾患の治療法の開発にもつながることが期待され、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the regulation mechanisms of functional relationship between nucleoli and stress granules (SGs), I focused on an RNA helicase, DDX17, and examined its subcellular localization and dynamics.

DDX17 has two isoforms, p72 and p82. I revealed that p82, which contains additional intrinsically disordered regions (IDRs) compared with p72, localized at the nucleoli. P82 showed slower dynamics than p72. Although both p72 and p82 localized to the SGs under the stress condition, p72 was predominantly incorporated into the SGs. Furthermore, the enzymatic mutants of both p72 and p82 accumulated into the SGs. The enzymatic mutant of p82 abolished nucleolar localization of p82. These results suggest that DDX17 links nucleoli to SGs in the IDRs and enzymatic activity-dependent manners.

研究分野：細胞生物学

キーワード：RNAヘリカーゼ DDX17 核小体 ストレス顆粒 天然変性領域 液-液相分離 membraneless organelles

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) 真核細胞内には、膜を持たないオルガネラ (membraneless organelles; MLOs) と呼ばれる (生体分子凝集体 (Biomolecular condensates) と呼ばれる) 構造体が存在する。MLOs は生体膜を持たない構造体であり、その構造は、そこに存在するタンパク質の天然変性領域 (intrinsically disordered regions; IDRs) や RNA による液-液相分離 (liquid-liquid phase separation; LLPS) により形成されることが明らかになっていた。核小体とストレス顆粒は、それぞれ核と細胞質に存在する MLOs である。核小体は数多くの因子が存在する MLOs であり、主な機能は rRNA (ribosomal RNA) の転写やプロセッシング、またリボソームサブユニットの構築といったリボソームの生合成である。一方、ストレス顆粒は熱ショックや酸化ストレスなど特定のストレスに応答して形成される MLOs である。ストレス顆粒には翻訳停止状態にある mRNP (messenger RNP) やリボソームの小サブユニットが集積していることが分かっているが、その機能は不明な部分が多い。核小体とストレス顆粒は共にリボソーム因子が集積している MLOs であり、核小体もまた rRNA の転写阻害や熱ショックなど特定のストレスによってその構造をダイナミックに変化させる。これらのことからリボソームの代謝やストレス応答に関して、核小体とストレス顆粒に機能的関連があることがうかがえるが、その関連についてはほとんど明らかになっていなかった。
- (2) DDX17 は RNA ヘリカーゼのタンパク質ファミリーである DEAD-box タンパク質に属するタンパク質であり、種々の RNA 代謝に関与する。DDX17 のアミノ酸領域には IDRs が含まれ、また翻訳開始点の違いから p72 と p82 の 2 つのアイソフォームが存在する。DDX17 の特定のアイソフォームおよび特定の変異体が核小体とストレス顆粒に局在することが分かっており、またいくつかのプロテオミクスによる解析から、DDX17 以外の DEAD-box タンパク質に関しても核小体とストレス顆粒に局在するものが存在することが示唆されていた。しかし、それらの細胞内局在の実態、また核小体とストレス顆粒それぞれにおける機能やその関連に関しては明らかにはなっていない。

### 2. 研究の目的

DDX17 を中心とした DEAD-box タンパク質という因子に着目し、それらの細胞内局在や動態、機能を詳細に解析することで、LLPS によって形成される構造体である核小体とストレス顆粒の機能的関連を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) P72 と p82 という 2 つのアイソフォームをもつ DDX17 に焦点を当て、予測サイトによりどのアミノ酸領域が IDRs であるのかを予測した。また N 末端に HA タグを付加した各種欠損変異体を発現させるコンストラクトを作製し、それらの HeLa 細胞内における局在を免疫蛍光顕微鏡法により観察した。
- (2) N 末端に GFP タグを付加した p72 および p82 を用い、蛍光退色後回復測定 (fluorescence recovery after photobleaching; FRAP) により、p72 および p82 の細胞内動態を測定した。
- (3) 高浸透圧ストレスにより p72 および p82 の細胞内動態がどのように変化するのかを免疫蛍光顕微鏡法により観察した。また p72 および p82 の酵素活性の欠失変異体が細胞内どのように局在するのかを免疫蛍光顕微鏡法により観察した。
- (4) DDX17 以外の DEAD-box タンパク質にも焦点を当て、それらの細胞内局在やストレス応答時における局在変化を観察した。

4. 研究成果

(1) P72 および p82 のどのアミノ酸領域が IDRs であるのかを、IDRs の予測サイトの一つである DISOPRED3 により予測した。その結果、p72 と p82 とともにその N 末端領域および C 末端領域は IDRs であることが予測された。特に、p82 のみに存在する 1-79 アミノ酸残基の領域は、ほとんどが IDRs であることが予測された。次に p72 および p82 の各種欠損変異体の細胞内局在を免疫蛍光顕微鏡法により観察したところ、p72 の全長は主に核質に局在したのに対し、p82 の全長は核小体、特に核小体の縁に局在した。一方、p82 の C 末端領域を欠損させた変異体は核小体に局在しなかった (図 1)。こうしたことから、p82 の核小体局在にはその N 末端領域にある IDRs が必要であるがそれだけでは十分ではなく、その核小体局在には C 末端領域の IDRs も重要であることが分かった。

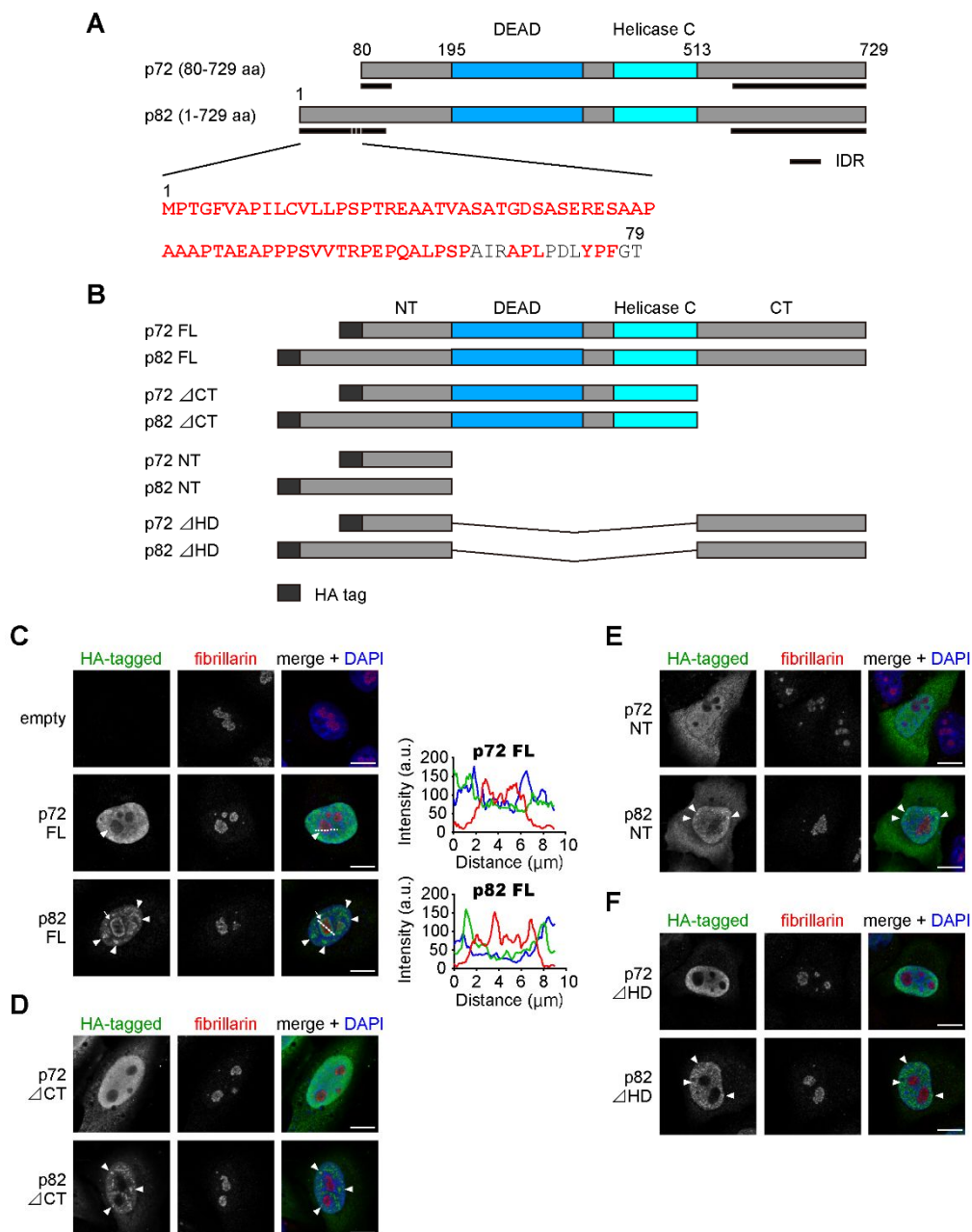
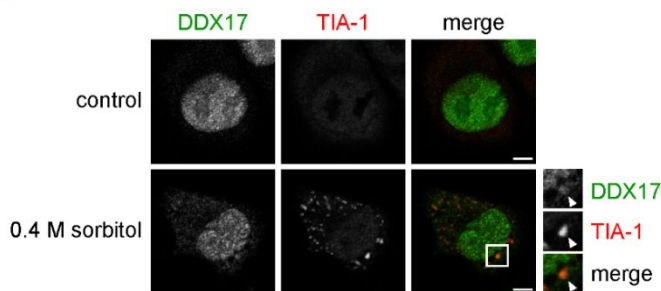


図 1 DDX17 の細胞内局在

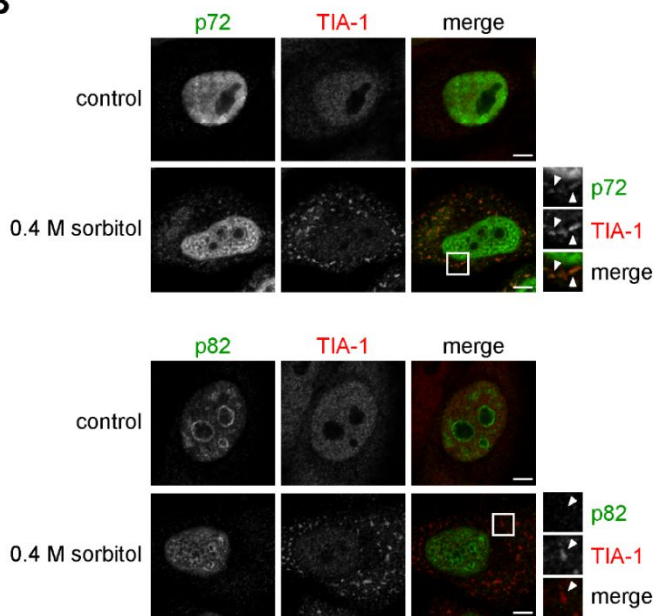
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

- (2) FRAP によって p72 および p82 の細胞内動態を測定した。その結果、p82 の細胞内動態は p72 のものに比べて遅いことが明らかになった。これにより、p82 のみに存在する IDRs は、その細胞内動態にも影響を与えていることが明らかになった。
- (3) ストレス応答時における p72 および p82 の細胞内局在変化を調べたところ、高浸透圧ストレス時には、p72 と p82 とともに一部ストレス顆粒への局在が観察され、その割合は p72 のほうが高いことが明らかになった。これにより、p82 のみに存在する IDRs 依存的な核小体局在は、ストレス条件下におけるストレス顆粒への局在にも影響を与えていることが明らかになった。また p72、p82 とともにその酵素活性の欠失変異体はストレス顆粒に局在することが明らかになった。これにより、その酵素活性は DEAD-box タンパク質の細胞内の特定の MLOs への局在を制御していることが明らかになった。

A



B



C

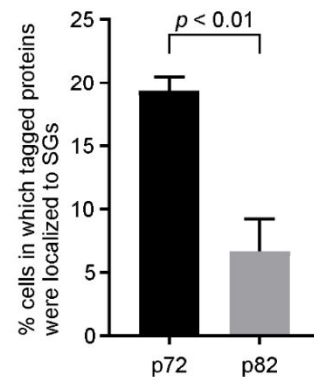


図2 DDX17 のストレス顆粒への局在

- (4) DDX17 以外の特定の DEAD-box タンパク質の、核小体とストレス顆粒を念頭に置いた細胞内局在を免疫蛍光顕微鏡法により観察した。現在のところ、核小体とストレス顆粒の両方に目立った局在を示すものは見出されていないが、特定の刺激において核小体局在を変化させるものが存在することが明らかになった。

以上の結果を総括すると、DDX17 は核小体とストレス顆粒の両方に局在する DEAD-box タンパク質であり、その局在や動態は IDRs によって制御されていることが明らかになった。こうしたことから、DDX17 は核小体とストレス顆粒を機能的に関連付ける DEAD-box タンパク質であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirai Yuya, Domae Eisuke, Yoshikawa Yoshihiro, Tomonaga Keizo	4. 巻 168
2. 論文標題 Differential roles of two DDX17 isoforms in the formation of membraneless organelles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 33~40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvaa023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平井悠哉, 牧野晶子, 岡村英幸, 朝長啓造
2. 発表標題 RNAヘリカーゼであるDDX17の2つのアイソフォームの機能相違の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------